

10, 081, 096

Aug-26, 2004

**Polychromatic fluorescence measurement device**

**Patent number:** DE10017825  
**Publication date:** 2001-10-18  
**Inventor:** UHL RAINER (DE)  
**Applicant:** TILL I D GMBH (DE)  
**Classification:**  
- **international:** G01N21/64; G01J3/443  
- **european:** G02B21/00M4A  
**Application number:** DE20001017825 20000410  
**Priority number(s):** DE20001017825 20000410

Also published as:

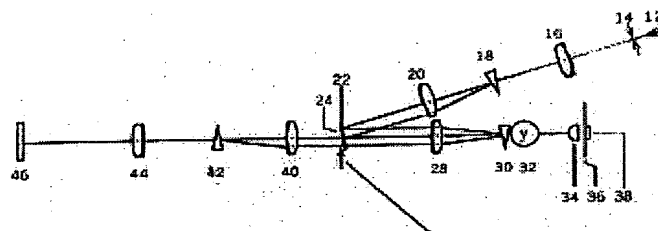


US6633381 (B2)  
US2001028455 (A1)

Abstract not available for DE10017825

Abstract of correspondent: **US2001028455**

A fluorescence-measuring device for scanning a specimen (36, 226) with a selection element (26, 206). Excitation light is coupled to an excitation beam path and guided to the specimen surface. Fluorescent light, which is emitted by the specimen surface, crosses the excitation beam path in a reverse direction and at the same time is decoupled from the excitation beam path. In the beam path, there is a first dispersive element (30, 210) so that the fluorescent light emitted by the specimen surface can strike the selection element spectrally split. The selection element includes a first area (48, 240) and a second area (26, 242) allowing selection between the excitation and fluorescent light. According to a first aspect, a spatial extension of a transmission area (26) is adjustable in order to adjust the transmitted wavelength range of the emission light. According to a second aspect, the selection element (206) makes it possible to operate with a coherent excitation having several laser lines. A two-dimensional confocal measurement arrangement can be accomplished and the emission light separated from the excitation light can be detected with spectral resolution



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**  
10 **DE 100 17 825 A 1**

51 Int. Cl. 7:  
**G 01 N 21/64**  
G 01 J 3/443

21 Aktenzeichen: 100 17 825.1  
22 Anmeldetag: 10. 4. 2000  
43 Offenlegungstag: 18. 10. 2001

DE 100 17 825 A 1

71 Anmelder:  
Till I.D. GmbH, 82166 Gräfelfing, DE  
74 Vertreter:  
Schwan Schwan Schorer, 81739 München

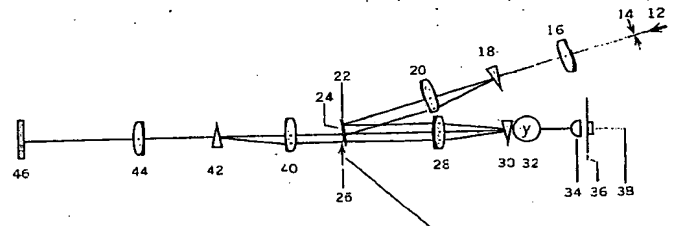
72 Erfinder:  
Uhl, Rainer, Prof. Dr., 82166 Gräfelfing, DE  
56 Entgegenhaltungen:  
DE 195 10 102 C1  
DE 43 30 347 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Polychromatische Fluoreszenz-Meßvorrichtung

57 Die Erfindung betrifft eine Fluoreszenz-Meßvorrichtung zum Abtasten einer Probenfläche (36, 226), mit einem Selektionselement (26, 206), mittels welchem Anregungslicht in einen Anregungsstrahlengang zur Probenfläche eingekoppelt und von der Probenfläche emittiertes Fluoreszenzlicht, das den Anregungsstrahlengang in umgekehrter Richtung durchläuft, aus dem Anregungsstrahlengang ausgekoppelt wird, wobei im Strahlengang ein erstes dispersives Element (30, 210) vorgesehen ist, so daß das von der Probenfläche emittierte Fluoreszenzlicht spektral aufgespalten auf dem Selektionselement auftrifft, wobei das Selektionselement einen ersten (48, 240) und einen zweiten Bereich (54, 242) aufweist, um die Selektion zwischen Anregungs- und Fluoreszenzlicht zu bewerkstelligen. Gemäß einem ersten Aspekt ist die räumliche Ausdehnung des Reflexions- (48, 50) und damit des Transmissionsbereichs (54) einstellbar, um den durchgelassenen Wellenlängenbereich des Emissionslichts einzustellen. Gemäß einem zweiten Aspekt ist das Selektionselement (206) so ausgebildet, daß bei kohärenter Anregung mit mehreren Laserlinien gleichzeitig operiert werden kann, sich eine 2-dimensional konfokale Meßanordnung realisieren läßt und das effizient vom Anregungslicht getrennte Emissionslicht mit spektraler Auflösung detektiert werden kann.



DE 100 17 825 A 1

## Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Fluoreszenz-Meßvorrichtung zum Abtasten einer Probenfläche gemäß dem Oberbegriff von Anspruch 1.

[0002] Bei der Auflicht-Fluoreszenz müssen Anregungs- und Emissionsstrahlengang miteinander vereint bzw. voneinander getrennt werden. Gewöhnlich geschieht dies mit Hilfe eines Farbteilers, der Licht unterhalb einer gewünschten Wellenlänge reflektiert und längerwelliges Licht transmittiert. Die Notwendigkeit eines solchen Filters steht einem schnellen Wechsel von Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge im Wege. Bei einem aus DE 195 10 102 C 1 bekannten, gattungsgemäßen konfokalen Fluoreszenzmikroskop wird das Problem dadurch umgangen, daß Anregungs- und Emissionsstrahlengang ohne Zuhilfenahme von Strahlteilern mit Hilfe dispersiver Elemente z. B. Prismen vereint bzw. wieder getrennt werden. Dabei wird das Gesichtsfeld mit einer Vielzahl spaltartiger oder punktförmiger "Lichtfenster" beleuchtet und das Präparat durch gleichzeitiges Bewegen dieser Beleuchtungsfelder parallel "abgetastet". Die vorliegende Erfindung zielt auf eine Fluoreszenzmeßvorrichtung, welche die genannten Vorteile der aus DE 195 10 102 C 1 bekannten Vorrichtung bewahrt, durch einen Verzicht auf Parallelabtastung und Beschränkung auf einzelne "Lichtfenster" jedoch einfacher zu realisieren ist, eine deutlich gesteigerte Fremdlicht-Unterdrückung aufweist, die freie, unabhängige Auswahl von Anregungswellenlänge, Emissionswellenlänge und Emissionsbandbreite gestattet, und in einer besonderen Ausgestaltung es sogar ermöglicht, mit mehreren Anregungswellenlängen simultan zu operieren und gleichzeitig die gesamte spektrale Information des Emissionslichtes einer Auswertung zugänglich zu machen.

[0003] Dieses Ziel wird in erfindungsgemäßer Weise erreicht durch Fluoreszenz-Meßvorrichtungen wie sie in Anspruch 1 bzw. 9 definiert sind.

[0004] Bei der Lösung gemäß Anspruch 1 ist die einfache und flexible Auswahl sowohl des detektierten Emissionswellenlängenbereichs als auch der gewünschten "Stoke's Shift" vorteilhaft.

[0005] Bei der Lösung gemäß Anspruch 9 ist vorteilhaft, daß bei mehreren Anregungs- und Emissionswellenlängen gleichzeitig gemessen werden kann und daß eine Konfokalität in zwei Raumrichtungen ermöglicht wird.

[0006] Anspruch 20 betrifft eine besondere Ausgestaltung des Selektionselements.

[0007] Bevorzugte Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen.

[0008] Im folgenden werden Ausführungsformen der Erfindung anhand der beigefügten Zeichnungen beispielhaft näher erläutert, wobei:

[0009] Fig. 1 schematisch den Strahlengang in einer Fluoreszenzmeßvorrichtung gemäß einer ersten Ausführungsform zeigt;

[0010] Fig. 2 eine vergrößerte Darstellung des Selektionselements aus Fig. 1 ist;

[0011] Fig. 3 eine schematische Darstellung des Strahlengangs einer Fluoreszenzmeßvorrichtung in einer zweiten Ausführungsform ist, bei der in der oberen Darstellung die Y-Richtung, und in der unteren Darstellung die X-Richtung die Querrichtung bildet, wobei der in diesem Fall aus der Bildebene herausragende Anregungsast nicht eingezeichnet ist, und

[0012] Fig. 4 die vergrößerte Darstellung eines Selektionselements ist, welches in der in Fig. 3 gezeigten Anordnung Anwendung finden kann.

[0013] Bei der ersten Ausführungsform der Erfindung ge-

maß Fig. 1 und 2 werden, anders als bei der aus DE 195 10 102 C 1 bekannten Lösung, nicht mehrere Spaltblenden gleichzeitig beleuchtet, sondern lediglich eine einzige. Sie braucht keine beugungslimitierte Höhe zu besitzen,

sondern kann als Streifen ausgedehnter Höhe das Präparat überdecken. Das auf dem Flächensensor registrierte Bild entspricht dann jeweils einem solchen Streifen, und das Gesamtbild muss aus mehreren solcher, mit dem Scanner über das Präparat geführten Streifen zusammengesetzt werden. Der Vorteil, der den Verzicht auf eindimensionale Konfokalität und die Geschwindigkeitssteigerung durch Parallelabtastung aufwiegt, liegt darin, daß sowohl die des Emissionsbandbreite, als auch die Stoke's Shift frei einstellbar sind.

[0014] Eine mögliche Ausgestaltung dieses Prinzips ist in Fig. 1 gezeigt. Auf einen engen Wellenlängenbereich begrenztes Licht einer Lichtquelle 12 - hier wird bevorzugt eine Galvanometermontierte Gitteranordnung analog zu der aus DE 42 28 366 A 1 bekannten Gitteranordnung eingesetzt - beleuchtet homogen einen in seiner Größe verstellbaren Spalt 14, welcher mit Hilfe einer Spektrometeranordnung - bestehend aus den abbildenden Elementen 16 und 20 und dazwischen einem dispersiven Element 18 - in eine Zwischenbildebene 22 abgebildet wird. Ein in dieser Zwischenbildebene plaziertes Umlenkelement 24 bildet gleichzeitig den festen Backen 48 einer Spaltanordnung 26. Das im Bereich des festen Backens 48 reflektierte und somit umgelenkte, monochromatische Anregungslicht passiert eine Tubulinse 28, die die Umlenkeinheit ins Unendliche abbildet, wird danach von einem zum dispersiven Element 18 in subtraktiver Dispersion betriebenen zweiten dispersiven Element 30 abgelenkt, und mittels eines drehbar gelagerten Umlenkspiegels 32 auf das Objektiv 34 gelenkt. Durch das Objektiv entsteht in der Präparatebene 36 ein (üblicherweise verkleinertes) Bild der ursprünglichen Spaltebene 14, welches durch Drehen des Umlenkspiegels 32 über das Präparat 38 bewegt werden kann. Das vom so beleuchteten Streifen des Präparats emittierte Licht durchläuft die optische Anordnung rückwärts, wird wegen seiner Rotverschiebung verglichen mit dem Anregungslicht vom dispersiven Element weniger stark abgelenkt und landet in der ersten Zwischenbildebene 22 als spektral verwaschener Streifen. Bei entsprechender Positionierung dieses Streifens relativ zu den Spaltbacken 48 und 50 der Spaltanordnung 26 kann durch Verstellen des verschiebbaren Spaltbackens 48 relativ zum festen Spaltbacken 50 die Breite des Spalts 54 vorgegeben und damit wie durch einen Spektrometerraustritts spalt die spektrale Bandbreite beeinflusst werden. Da jedoch sowohl im Anregungs-, als auch im Emissionsstrahlengang die Strahlposition in der Zwischenbildebene mit wechselnder Wellenlänge wechselt, muss entweder das gesamte Umlenkelement 24 mitsamt der beiden Spalte der gewünschten Wellenlänge entsprechend verschoben werden, oder es muss in der Nähe des dispersiven Elements 18 eine verstellbare Umlenkeinheit in den Strahl eingebracht werden, welche den Anregungsstrahl auf der Umlenkeinheit positioniert. Jede der genannten Verstellmöglichkeiten dient der Platzierung des Anregungsstrahls auf dem reflektierenden Teil des Umlenkelements 48 und damit der Einstellung der gewünschten Stoke's Shift.

[0015] Das spektral verwaschene Zwischenbild kann die Umlenkeinheit im nicht verspiegelten, sondern nur entspiegelten Teil 54 passieren und wird durch eine in umgekehrter Dispersion betriebene Spektrometeranordnung, bestehend aus einem optischen Element 40, welches die Zwischenbildebene ins Unendliche abbildet, einem dispersiven Element 42, das die spektrale Aufspaltung rückgängig macht, und einem weiteren optischen Element 44, welches das Strahlbündel wieder fokussiert, auf den Flächensensor 46 abgebildet,

wo ein nunmehr wieder "unverwaschenes" Bild des beleuchteten Streifens resultiert. Aus mehreren solcher Streifenbilder, welche jeweils nach Rotation des Spiegels 32 aufgenommen wurden, lässt sich dann ein Gesamtbild zusammensetzen. Als Nachteil zu werten ist dabei, daß die Stoke's Shift, d. h. die Verschiebung zwischen Anregungswellenlänge und Emissionswellenlänge, nur bei einem infinitesimal schmalen Spalt für jeden Bildpunkt konstant ist. Bei einem aus mehreren Zeilen des Sensors zusammengesetzten Streifenbild nimmt die Stoke's Shift mit jeder Zeile um ein endliches  $\Delta\lambda$  zu. Als Vorteil zu werten ist dagegen, daß das System einen rechteckigen Wellenlängen-Durchlaßbereich besitzt, d. h. die spektrale Durchlässigkeit erreicht, anders als ein Filtersystem, im gesamten Durchlaßbereich 100%.

[0016] Die mit der beschriebenen Anordnung erzielbare minimale Stoke's Shift wird durch die spektrale Bandbreite des Anregungslichtes vorgegeben. Verwendet man zur streifenförmigen Ausleuchtung der Zwischenbildebene 22 eine kohärente, sehr monochromatische Anregungslichtquelle, wird diese Limitation beseitigt und es kann die gesamte optische Anordnung der Elemente 16-20 weggelassen werden. Geht man noch einen Schritt weiter und reduziert den kohärent beleuchteten Streifen in seiner schmalen Dimension auf eine beugungslimitierte Breite, so resultiert in der Zwischenbildebene 22, d. h. zwischen den Spaltbacken, eine zweidimensionale Intensitätsverteilung des Emissionslichtes, welche in eine Richtung ausschließlich räumlich, in die andere Richtung ausschließlich spektral zu interpretieren ist. Für eine spektral aufgelösten Auslese genügt es jedoch nicht, diese zweidimensionale Intensitätsverteilung auf einen Flächensensor abzubilden, weil auf diese Weise das um viele Größenordnungen intensivere Anregungslicht durch Streuung bzw. Reflexion an den diversen optischen Elementen für zu viel Falschlicht sorgen würde. Zur Behebung des Problems bedient man sich vorzugsweise wieder der subtraktiven Dispersion, d. h. man lässt das Signal eine weitere Spektrometeranordnung durchlaufen, welche die vorausgegangene Dispersion rückgängig macht. Eine besonders elegante Anordnung dieser Art, bei der statt eines Spalts, der nur in einer Dimension über das Präparat geführt werden muss, ein beugungslimitierter "Spot" das Präparat in zwei orthogonalen Dimensionen abtastet, ist im folgenden beschrieben.

[0017] Bei der Ausführungsform gemäß Fig. 1 und 2 war eine Laserlichtquelle optional, bei der echt konfokalen Ausführungsform gemäß Fig. 3 und 4 ist sie zur Anregung unabdingbar. Da das Präparat in zwei voneinander unabhängigen Dimensionen x und y "abgetastet (gerastert)" werden soll, muß der Emissionsstrahlengang nicht nur spektral aufgespalten und wieder vereint, sondern auch in zwei Dimensionen durch eine konfokale Blende geführt werden. Von den vielen prinzipiell möglichen, die genannten Vorgaben erfüllenden Anordnungen besticht die in Fig. 3 und 4 gezeigte Variante durch eine relativ einfache Realisierbarkeit und vor allem durch die Freiheit, bei mehreren Anregungs- und Emissionswellenlängen gleichzeitig messen zu können.

[0018] Kollimiertes Laserlicht 200 wird mit Hilfe eines dispersiven Elements 202 spektral abgelenkt und mit Hilfe eines optischen Elements 204 auf ein in spezieller Weise gemäß Fig. 4 teilweise verspiegeltes Strahlteilerelement 206 fokussiert. Dieses Element ist außerhalb der reflektierenden Bereiche 240 transparent 242. Das dispersive Element 202 sorgt dafür, daß sich die Positionen beugungslimitierter Fokuspunkte auf dem Strahlteilerelement 206 auf einer Linie fortbewegen, wenn die Wellenlänge des Laserstrahls variiert wird. Da es gewöhnlich nur eine begrenzte Anzahl von Laserwellenlängen gibt, genügen entsprechend wenige verspiegelte Punkte an den entsprechenden Positionen des

Strahlteilerelements 206, um alle möglichen Anregungswellenlängen gleichzeitig oder nacheinander in den Strahlengang einzukoppeln. Aus technischen Gründen sollte die Ebene des Strahlteilerelements 206 vorzugsweise relativ senkrecht stehen, d. h. lediglich einen kleinen Umlenkwinkel aufweisen. Das Strahlteilerelement 206 wird mit Hilfe eines optischen Elements 208 ins Unendliche abgebildet, mit Hilfe eines zum Element 202 identischen dispersiven Elements 210, welches die Dispersion von 202 rückgängig macht, wieder kollimiert, und mit Hilfe eines Scanelements 212 in eine Richtung (hier die x-Richtung) abgelenkt. Ein weiteres, abbildendes optisches Element 214 fokussiert den Strahl wieder und erzeugt in seiner Fokusebene 216 einen beugungslimitierten Fokuspunkt, der sich mit der Scanbewegung des Scanelements 212 in der x-Dimension bewegt. Ein weiteres optisches Element 218 bildet den Fokuspunkt wieder ins Unendliche ab, ein weiteres Scanelement 220 sorgt für eine Ablenkung des Strahls in y-Richtung, und ein Objektiv 222 bildet den nun in zwei orthogonalen Dimensionen gescannten Strahl in die Objektebene 224 ab, in der sich das zu untersuchende Präparat 226 befindet. Das vom jeweils beleuchteten Teil des Präparats emittierte Licht durchläuft die optische Anordnung rückwärts und wird dabei gleichzeitig spektral aufgespalten. Durch die sog. Stoke's Shift, d. h. die Tatsache, daß emittiertes Licht immer längerwellig ist als das dazugehörige Anregungslicht, landet der Fokuspunkt immer in einer gegenüber seinem Ausgangspunkt auf einer Gerade verschobenen Position der Zwischenbildebene 206. Da auf dieser Linie lediglich die den Spot-Auftreffstellen für die verschiedenen Laserwellenlängen entsprechenden Punkte verspiegelt sind (siehe Fig. 4), wird das emittierte Licht größtenteils nicht reflektiert, sondern transmittiert. Eine weitere Spektrometeranordnung, bestehend aus einem ins unendliche abbildendem Element 230, einem dispersivem Element 232, welches die Dispersion von Element 210 rückgängig macht, und einem abbildenden optischen Element 234, erzeugt in der Fokusebene 236 des Elements 234 einen Punkt, dessen Ausdehnung durch eine in zwei Dimensionen einstellbare Blendeneinrichtung 228, 238 in Art einer konfokalen Blende beeinflusst werden kann. Durch die beschriebene subtraktive Dispersion wird sichergestellt, daß nur Licht, das den Linienbereich des Strahlteilerelements 206 passiert hat und die seiner Position auf der Linie entsprechende Wellenlänge hat, die Blende passieren kann. Streulicht wird dadurch effektiv eliminiert.

[0019] Das die konfokale Blendenkombination 228, 238 passierende Licht ist in zwei Dimensionen konfokal und enthält alle Wellenlängen mit Ausnahme der "ausgefilterten" Anregungswellenlängen. Es kann nun mit Hilfe von Strahlteilern oder dispersiven Elementen wieder spektral aufgespalten und mehreren Detektoren zur spektral aufgelösten Registrierung zugeführt werden, d. h. es ist möglich, bei mehreren Emissionswellenlängen gleichzeitig zu messen. Als Detektoren kommen einzelne, diskret aufgebaute Licht-Sensoren (z. B. Photomultiplier oder Avalanche-Photodioden), aber auch die Pixel eines Zeilen- oder Flächensensors in Betracht. Besonders vorteilhaft ist die Verteilung des Spektrums mit Hilfe eines dispersiven Elements auf mehrere Pixel eines Zeilen oder Flächensensors analog zur DE-198 01 139 A1 beschriebenen Vorgehensweise, weil diese Sensoren gewöhnlich eine höhere Quantenausbeute als Photomultiplier aufweisen. Besitzt der Sensor in der "spektralen" Dimension mehr Pixel, als es die gewünschte spektrale Auflösung erforderlich macht, muß dem durch entsprechend flexible elektronische Auslesemodi, d. h. sogenanntes "Binnen" von Pixeln und das "Wegwerfen" unerwünschter Information Rechnung getragen werden. Handelt

es sich um einen Flächensensor, der auch noch in der zur "spektralen Dimension" orthogonalen Dimension eine Ausdehnung hat, verteilt man das durch den ursprünglichen Scanvorgang in ein "zeitliches Nacheinander" gebrachte "räumliche Nebeneinander im Präparat" mit Hilfe einer weiteren Scanvorrichtung wieder in ein "räumliches Nebeneinander" auf dem Chip, wobei die Zeilen des Abtastvorgangs durchaus nicht mit den Zeilen des Chips synchron laufen müssen. Ein weiterer, wesentlicher Vorteil der beschriebenen Anordnung ist, daß gleichzeitig oder auch schnell nacheinander mit mehreren Anregungswellenlängen gemessen werden kann.

[0020] Diese müssen lediglich gleichzeitig bzw. schnell nacheinander in dem kollimierten Laserstrahl 200 enthalten sein. Dies wird erreicht durch Verwendung eines Lasers, der gleichzeitig mehrere Linien aufweist, oder durch die kollimare Einkopplung unterschiedlicher Laser in einen Laserstrahl. Letzteres lässt sich durch dichroitische Strahlteiler, besser jedoch durch eine Spektrometeranordnung erreichen, in der ein dispersives Element verschiedene, durch die jeweilige Wellenlänge vorgegebene Eintrittswinkel in einen gemeinsamen Austrittswinkel umsetzt, wie dies in DE 41 15 401 beschrieben ist. Alternativ kann auch eine Galvanometermontierte Gitteranordnung, analog zur in DE-42 28 366 A1 beschriebenen verwandt werden, um in Millisekunden zwischen verschiedenen Laserlichtquellen und damit Wellenlängen hin und her zu schalten. Als dispersives Element muß dabei, wie die Erfahrung gezeigt hat, nicht unbedingt auf ein holographisches Volumengitter zurückgegriffen werden, es lässt sich z. B. auch mit geritzten Gittern das erforderliche geringe Trägheitsmoment erzielen. Im einfachsten Fall wird die Lasereinkopplung sowohl in das Spektrometer, als auch in das polychromatische Fluoreszenzmikroskop, mit Fasern realisiert.

[0021] Zu beiden gezeigten optischen Anordnungen ist zu sagen, daß der Strahlengang vorzugsweise telezentrisch ausgelegt sein sollte, d. h. daß die Brennebenen aufeinanderfolgender abbildender Elemente aufeinander zu liegen kommen. Diese Ebenen bieten sich gleichzeitig als Orte für die Platzierung von Elementen an, welche dazu dienen, den Strahl spektral (Dispersionselemente) bzw. im Zusammenhang mit der Raster-Abtastung (Scanelemente) des Präparats abzulenken. Durch eine solche Platzierung wird gewährleistet, daß der Pupillenstrahlengang beim Scanvorgang bzw. bei der spektralen Aufspaltung ortsfest bleibt. Wo eine solche Platzierung nicht möglich ist, beispielsweise weil zwei Elemente nicht genau an der selben Stelle sitzen können oder weil eine Brennebene nicht direkt zugänglich ist, sollte entweder so nahe wie möglich an der optimalen Position platziert werden, um den Strahlversatz zu minimieren, oder aber es muss noch eine Zwischenabbildung eingeführt werden, damit die ideale Position zugänglich gemacht wird.

[0022] Bei den in den Abbildungen beschriebenen Ausführungsformen sind dispersiven Elemente zweidimensional ausgelegt, um eine maximale Störlichtunterdrückung zu gewährleisten. Natürlich ist zur Vereinfachung der optischen Anordnung auch eine Dispersion lediglich in einer Dimension vorstellbar.

[0023] Die Selektionselemente 26 bzw. 206 werden im gezeigten Beispiel so betrieben, daß das Anregungslicht mittels Reflexion im reflektierenden Bereich in den Anregungsstrahlengang eingekoppelt und das Fluoreszenzlicht mittels Transmission durch den transmittierenden Bereich eingekoppelt wird, wobei die räumliche Begrenzung des transmittierenden Bereichs als Wellenlängenbegrenzung für das zu detektierende Fluoreszenzlicht wirkt. Grundsätzlich kann dieses Prinzip jedoch auch umgekehrt werden, so daß das Anregungslicht in gerader Linie durch den transmittieren-

den Bereich hindurch in den Anregungsstrahlengang eingekoppelt wird, während das Fluoreszenzlicht mittels Reflexion im reflektierenden Bereich für die Detektion ausgekoppelt wird, wobei dann die räumliche Begrenzung des reflektierenden Bereichs als Wellenlängenbegrenzung für das zu detektierende Fluoreszenzlicht wirkt. Es ist auch eine Anordnung vorstellbar, bei der sowohl Anregungs-, als auch Emissionslicht vom Selektionselement reflektiert werden. Die reflektierten Strahlbündel müssen sich dabei in ihrem Winkel so unterscheiden, daß eine effiziente Strahltrennung möglich wird.

#### Patentansprüche

1. Fluoreszenz-Meßvorrichtung zum Abtasten einer Probenfläche (36), mit einem Selektionselement (26), mit dessen Hilfe Anregungslicht in einen Anregungsstrahlengang eingekoppelt und zur Probenfläche geführt wird und gleichzeitig von der Probenfläche emittiertes Fluoreszenzlicht, welches den Anregungsstrahlengang in umgekehrter Richtung durchläuft, aus dem Anregungsstrahlengang auskoppelt und der Registrierung durch einen Detektor (46) zugeführt wird, wobei in dem Anregungsstrahlengang ein erstes dispersives Element (30) vorgesehen ist, so daß das von der Probenfläche emittierte Fluoreszenzlicht spektral aufgespalten auf dem Selektionselement auftrifft, wobei das Selektionselement einen ersten (48) und einen räumlich davon getrennten zweiten Bereich (54) aufweist, wobei das auf den ersten Bereich auftreffende Anregungslicht eingekoppelt wird, während der zweite Bereich zum Auskoppeln des von der Probenfläche emittierten Fluoreszenzlichts dient, wobei das von dem Selektionselement ausgekoppelte Licht ein zweites dispersives Element (42) durchläuft, das bezüglich des ersten dispersiven Elements (30) subtraktiv wirkt und wobei die Begrenzungen (48, 50) des zweiten Bereichs (54) im Zusammenspiel mit dem zweiten dispersiven Element als Wellenlängenbegrenzung für das Fluoreszenzlicht wirkt, um mindestens den Wellenlängenbereich des Anregungslichts auszublenden, **dadurch gekennzeichnet**, daß die räumliche Ausdehnung des zweiten Bereichs (54) einstellbar ist, um der ausgekoppelten Wellenlängenbereich des Fluoreszenzlichts und damit seine Stoke's-Shift relative zum Anregungslicht einzustellen.
2. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der erste Bereich (48) reflektierend und der zweite Bereich (54) transmittierend ausgebildet ist.
3. Vorrichtung gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der transmittierende Bereich (54) spaltförmig ausgebildet ist, wobei der reflektierende Bereich (48) den Spalt auf der einen Seite begrenzt und die andere Begrenzung von einem verstellbaren Balken (50) gebildet wird.
4. Vorrichtung gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Anregungslicht einen Spalt (14) durchläuft, der auf den reflektierenden Bereich (48) des Selektionselements (26) abgebildet wird.
5. Vorrichtung gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Anregungslicht inkohärent ist und vor den Auftreffen auf dem Selektionselement (26) ein drittes dispersives Element (18) durchläuft, welches bezüglich des ersten dispersiven Elements (30) subtraktiv betrieben wird.
6. Vorrichtung gemäß Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Anregungslicht kohärent und hochmonochromatisch ist und als beugungslimitierter

Streifen auf der Probenfläche (36) abgebildet wird.

7. Vorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sich das Selektionselement (26) in einer zu der Probenfläche (36) konjugierten Ebene befindet.

8. Vorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sich das Selektionselement (26) in einer zu dem Detektor (46) konjugierten Ebene befindet.

9. Fluoreszenz-Meßvorrichtung zum Abtasten einer Probenfläche (224), mit einem Selektionselement (206), mit dessen Hilfe Anregungslicht in einen Anregungsstrahlengang eingekoppelt und zur Probenfläche geführt wird und gleichzeitig von der Probenfläche emittiertes Fluoreszenzlicht, welches den Anregungsstrahlengang in umgekehrter Richtung durchläuft, aus dem Anregungsstrahlengang auskoppelt und der Registrierung durch einen Detektor zugeführt wird, wobei in dem Anregungsstrahlengang ein erstes dispersives Element (210) vorgesehen ist, so daß das von der Probenfläche emittierte Fluoreszenzlicht spektral aufgespalten auf dem Selektionselement auftritt, wobei das Selektionselement einen ersten (240) und einen räumlich davon getrennten zweiten Bereich (242) aufweist, wobei das auf den ersten Bereich auftreffende Anregungslicht eingekoppelt wird, während der zweite Bereich zum Auskoppeln des von der Probenfläche emittierten Fluoreszenzlichts dient, wobei das von dem Selektionselement ausgekoppelte Licht ein zweites dispersives Element (232) durchläuft, das bezüglich des ersten dispersiven Elements subtraktiv wirkt und wobei die Begrenzung des zweiten Bereichs im Zusammenspiel mit dem zweiten dispersiven Element und als Wellenlängenbegrenzung für das Fluoreszenzlicht wirkt, um mindestens den Wellenlängenbereich des Anregungslichts auszublenden, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung für eine kohärente Anregung mit einer oder mehreren getrennten Laser-Spektrallinien ausgebildet ist, wobei Anregungslicht jeder Spektrallinie in einen eigenen durch die Wellenlänge bestimmten Bereich (240) auf dem Selektionselement (206) fokussiert wird, wobei diese Abbildungsbereiche den ersten Bereich (240) bilden und der Bereich zwischen den Abbildungsbereichen sowie ein Bereich, der bezüglich der Aufspaltung des Fluoreszenzlichts durch das erste dispersive Element sich in Richtung zunehmender Wellenlänge an den letzten Abbildungsbereich anschließt, mindestens einen Teil des zweiten Bereichs (242) bilden.

10. Vorrichtung gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der erste Bereich (240) reflektierend und der zweite Bereich (242) transmittierend ausgebildet ist.

11. Vorrichtung gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß Anregungslicht jeder Spektrallinie als beugungslimitierter Spot auf das Selektionselement (206) abgebildet wird.

12. Vorrichtung gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß nur die Bereiche (240) des Selektionselements, in welchen die Spots liegen, reflektierend ausgebildet sind, während die übrigen Bereiche (242) transmittierend ausgebildet sind.

13. Vorrichtung gemäß Anspruch 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Anregungslicht einen die Spektrallinien gleichzeitig enthaltenden kollimierten Strahl bildet, der ein drittes dispersives Element (202) durchläuft, welches bezüglich des ersten dispersiven Elements (210) subtraktiv betrieben wird, bevor das Anregungslicht auf das Selektionselement (206) auftritt.

gungslicht auf das Selektionselement (206) auftritt.

14. Vorrichtung gemäß Anspruch 9 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Anregungslicht als beugungsbegrenzter Spot auf die Probenfläche (224) abgebildet wird und für das Fluoreszenzlicht für jede der beiden Raumrichtungen eine konfokale Blende (228, 238) vorgesehen ist.

15. Vorrichtung gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß das erste (210), das zweite (232) und das dritte dispersive Element (202) jeweils in zwei orthogonalen Richtungen dispersiv wirken.

16. Vorrichtung gemäß Anspruch 9 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß das Selektionselement (206) in eine erste Ebene (216) abgebildet wird, welche in einer zur Probenfläche (224) konjugierten Ebene liegt.

17. Vorrichtung gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen der ersten Ebene (216) und der Probenfläche (224) eine erste Ablenkeinheit (220) vorgesehen ist, welche das Anregungslicht in eine erste Raumrichtung ablenkt, um den Anregungslichtspot über die Probenfläche (224) zu führen.

18. Vorrichtung gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen der ersten Ebene (216) und dem Selektionselement (206) eine zweite Ablenkeinheit (212) vorgesehen ist, welche das Anregungslicht eine zweite, zu der ersten Ablenkrichtung senkrechten Raumrichtung ablenkt.

19. Vorrichtung gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die konfokalen Blenden (228, 238) in einer zur Ebene des Selektionselements (206) konjugierten Ebene (236) liegen.

20. Fluoreszenz-Meßvorrichtung zum Abtasten einer Probenfläche, mit einem Selektionselement, mit dessen Hilfe Anregungslicht in einen Anregungsstrahlengang eingekoppelt und zur Probenfläche geführt wird und gleichzeitig von der Probenfläche emittiertes Fluoreszenzlicht, welches den Anregungsstrahlengang in umgekehrter Richtung durchläuft, aus dem Anregungsstrahlengang auskoppelt und der Registrierung durch einen Detektor zugeführt wird, wobei in dem Anregungsstrahlengang ein erstes dispersives Element vorgesehen ist, so daß das von der Probenfläche emittierte Fluoreszenzlicht spektral aufgespalten auf dem Selektionselement auftritt, wobei das Selektionselement einen ersten und einen räumlich davon getrennten zweiten Bereich aufweist, wobei das auf den ersten Bereich auftreffende Anregungslicht eingekoppelt wird, während der zweite Bereich zum Auskoppeln des von der Probenfläche emittierten Fluoreszenzlichts dient, wobei das von dem Selektionselement ausgekoppelte Licht ein zweites dispersives Element durchläuft, das bezüglich des ersten dispersiven Elements subtraktiv wirkt und wobei die Begrenzung des zweiten Bereichs im Zusammenspiel mit dem zweiten dispersiven Element als Wellenlängenbegrenzung für das Fluoreszenzlicht wirkt, um mindestens den Wellenlängenbereich des Anregungslichts auszublenden, dadurch gekennzeichnet, daß der erste Bereich und der zweite Bereich reflektierend ausgebildet sind und gegeneinander verkippt sind, um einfallendes Licht in unterschiedliche Richtungen zu reflektieren.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

---



Fig. 1

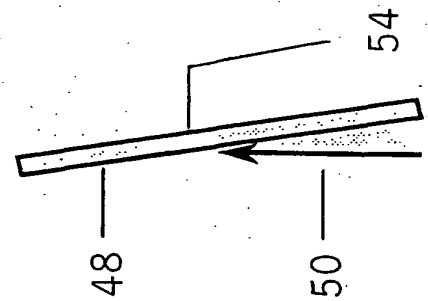
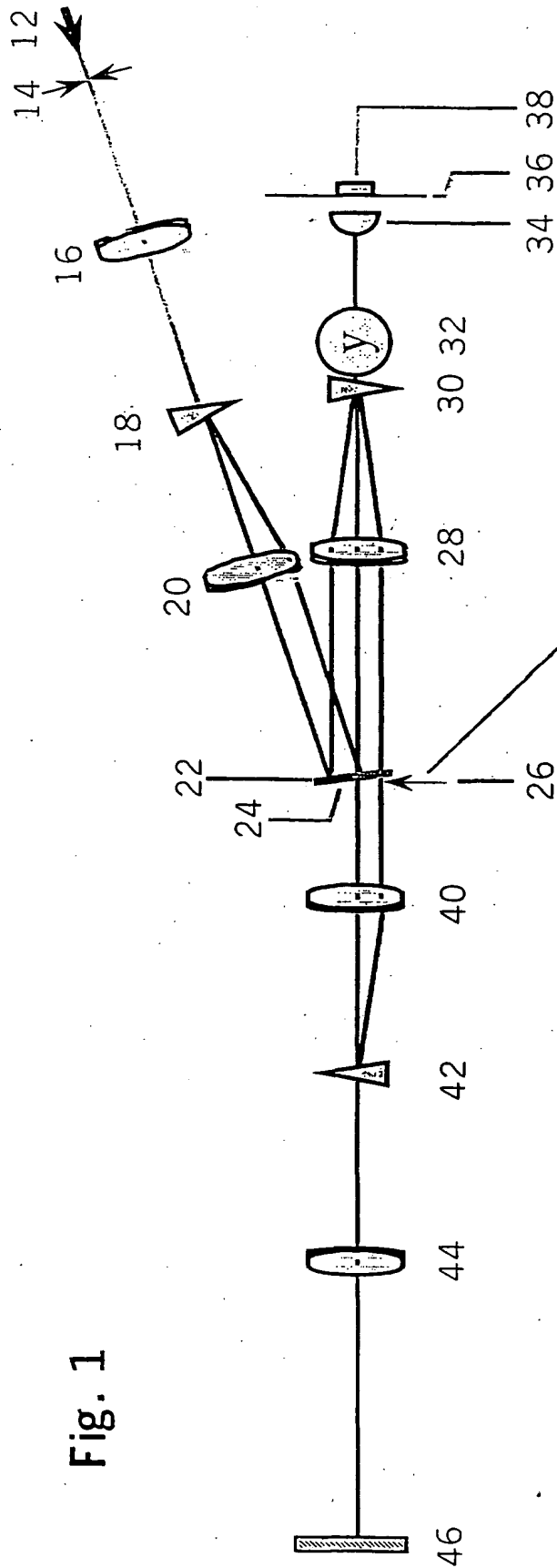


Fig. 2

